

# 牛膝总皂苷提取物对自发性高血压大鼠血管内皮功能损伤的改善作用及机制研究<sup>Δ</sup>

梁瑞峰<sup>1,2\*</sup>, 葛文静<sup>1</sup>, 寇晓波<sup>1,2</sup>, 田萍<sup>1</sup>, 安鸿志<sup>1</sup>, 魏征<sup>1</sup>, 张明利<sup>1#</sup> (1. 河南省中西医结合医院/河南省中医药研究院中心实验室, 郑州 450004; 2. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

中图分类号 R965; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0331-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.10



**摘要** **目的** 基于细胞色素P450 4A(CYP4A)/20-羟-二十烷四烯酸(20-HETE)/G蛋白偶联受体75(GPR75)轴探究牛膝总皂苷(ABS)提取物对自发性高血压大鼠(SHR)血管内皮功能损伤的改善作用及机制。**方法** 将10只Wistar-Kyoto大鼠设为正常对照组;将40只SHR根据收缩压进行分层后,按随机数字表法分为模型组(MOD组)、卡托普利阳性对照组(CAP组,10 mg/kg)和ABS提取物低、高剂量组(ABS-L、ABS-H组,60、120 mg/kg),每组10只。各组动物灌胃相应药物或等体积纯水,每天1次,连续28 d。末次给药后,测量大鼠收缩压,检测血清中血管活性物质、炎症因子和氧化应激指标水平,观察大鼠胸主动脉病理形态学变化,检测胸主动脉组织中活性氧(ROS)水平及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、CYP4A、GPR75、核因子-κB p65(NF-κB p65)、磷酸化NF-κB p65、p22<sup>phox</sup>、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(NOX4)的表达。**结果** 给药28 d后,与MOD组比较,ABS-L、ABS-H组大鼠收缩压及血清中20-HETE、血管紧张素II、内皮素1、白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α、细胞间黏附分子1和丙二醛水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );一氧化氮、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );胸主动脉内膜损伤减轻,内皮细胞形态改善;胸主动脉中ROS、CYP4A、GPR75、p22<sup>phox</sup>和NOX4的表达及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著下调/降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),eNOS的表达均显著上调( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** ABS提取物可能通过下调CYP4A表达,减少20-HETE生成,抑制GPR75激活,进而抑制下游NF-κB和NOX4的活化,有效减轻SHR的炎症反应和氧化应激,从而改善其高血压相关血管内皮功能损伤。

**关键词** 牛膝总皂苷提取物;高血压;血管内皮功能损伤;20-羟-二十烷四烯酸;细胞色素P450 4A

## Improvement effects and mechanism of *Achyranthes bidentata* total saponins extract on vascular endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats

LIANG Ruifeng<sup>1,2</sup>, GE Wenjing<sup>1</sup>, KOU Xiaobo<sup>1,2</sup>, TIAN Ping<sup>1</sup>, AN Hongzhi<sup>1</sup>, WEI Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Mingli<sup>1</sup> (1. Central Laboratory, Henan Integrative Medicine Hospital/Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the improvement effects and mechanism of *Achyranthes bidentata* total saponins (ABS) extract on vascular endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat (SHR) based on cytochrome P450 4A (CYP4A)/20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)/G protein-coupled receptor 75 (GPR75) axis. **METHODS** Ten Wistar-Kyoto rats were taken as the normal control group. Forty SHR were first stratified by systolic blood pressure and then, within each stratum, randomly assigned using a random-number table to the model group (MOD group), captopril positive control group (CAP group, 10 mg/kg), ABS low- and high-dose extract groups (ABS-L group, ABS-H group, 60 and 120 mg/kg), with 10 rats in each group. Animals in each group were given the corresponding drug or equal volume of pure water by gavage, once a day, for 28 consecutive days. After the last administration, systolic blood pressure of rats was measured. The levels of vasoactive substances, inflammatory factors and oxidative stress indicators in serum were measured. The pathological changes of rat thoracic aorta were observed. The level of reactive oxygen species (ROS) in aortic tissue was analyzed. The expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), CYP4A, GPR75, nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65), phosphorylated NF-κB p65, p22<sup>phox</sup>, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) in thoracic aorta tissue were detected. **RESULTS** After 28 d of treatment, compared with MOD group, the systolic blood pressure of rats in the ABS-L and ABS-H groups

<sup>Δ</sup> 基金项目 河南省科技发展计划项目(No.242300420104);河南省中西医结合医院基本科研业务费立项项目(No.2404038)

\* 第一作者 副研究员,硕士生导师,硕士。研究方向:中药药理及中药药性理论。E-mail:hnsxm009@163.com

# 通信作者 主任医师,硕士生导师。研究方向:中医药防治呼吸及心血管疾病。E-mail:yanjy6633@126.com

decreased significantly. The levels of 20-HETE, angiotensin II, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , intercellular cell adhesion molecule-1 and malondialdehyde in serum were significantly reduced ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the levels of nitric oxide, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Intimal damage of thoracic aorta was reduced, and endothelial cell morphology was improved. The expressions of ROS, CYP4A, GPR75, p22<sup>phox</sup>, NOX4 and the phosphorylation level of NF- $\kappa$ B p65 protein in thoracic aorta were down-regulated or reduced ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the expression of eNOS was up-regulated ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** ABS extract may alleviate the inflammatory response and oxidative stress in SHR effectively by down-regulating the expression of CYP4A, reducing the production of 20-HETE, inhibiting the activation of GPR75, and subsequently suppressing the activation of downstream NF- $\kappa$ B and NOX4, thereby improving hypertension-related vascular endothelial dysfunction.

**KEYWORDS** *Achyranthes bidentata* total saponins extract; hypertension; vascular endothelial dysfunction; 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; cytochrome P450 4A

高血压是临床常见的心血管疾病,发病率呈逐年上升趋势,且发病群体日益年轻化<sup>[1]</sup>。研究表明,高血压可导致血管内皮功能损伤,而内皮功能损伤是心、肾、脑、血管等靶器官损害的关键驱动因素<sup>[2]</sup>。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是一种多不饱和脂肪酸,能够通过环氧化酶、脂氧合酶和细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)等不同代谢途径,生成一系列活性产物;这些活性产物既可促进血管舒张、抑制炎症,也可诱发血管收缩、氧化应激及炎症损伤<sup>[3]</sup>。其中,CYP4A 会催化 AA 生成 20-羟-二十烷四烯酸(20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE), 20-HETE 不仅可直接诱导平滑肌细胞膜去极化、增加细胞内钙离子浓度,从而引发血管收缩,还能与 G 蛋白偶联受体 75(G protein-coupled receptor 75, GPR75)偶联,进而激活下游核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)通路及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶系统,促进炎症反应和氧化应激的发生<sup>[4]</sup>。而炎症反应的加剧和氧化应激水平的升高,会降低一氧化氮(nitric oxide, NO)的生物利用度、诱导内皮细胞损伤及促进血小板黏附聚集,这是导致血管内皮功能障碍的重要机制<sup>[5]</sup>。因此,调控 AA 代谢过程,尤其是抑制 CYP4A/20-HETE/GPR75 轴的活性,可能是改善高血压相关内皮功能损伤的有效策略。

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,具有逐瘀通经、滋补肝肾、引血下行之功效,常用于治疗高血压、关节炎、水肿等<sup>[6]</sup>,其主要有效成分牛膝总皂苷(*A. bidentata* saponins, ABS)为三萜类化合物<sup>[7]</sup>。既往研究表明,ABS 可改善急性心肌缺血大鼠的血管内皮功能损伤,并促进 NO 分泌<sup>[8]</sup>;同时,其还能调控关节炎大鼠的 AA 代谢,减轻炎症反应<sup>[9]</sup>。鉴于 ABS 在保护血管内皮功能、调节 AA 代谢及减轻炎症反应等方面的活性与高血压相关内皮功能损伤的关键病理机制高度契合,本课题组推测 ABS 可能对高血压相关内皮功能损伤

具有潜在的改善作用。因此,本研究拟观察 ABS 提取物对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)血管活性物质、炎症因子、CYP4A/20-HETE/GPR75 轴等的影响,为进一步阐明其改善高血压相关内皮功能损伤的作用及潜在机制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有: Synergy NEO 型全功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), RM2245 型切片机(德国 Leica 公司), BP-2010A 型动物无创血压仪(日本 Softron 株式会社), IX73 型荧光显微镜、CX33 型光学显微镜(日本 Olympus 公司), Fluor Chem R 型凝胶成像分析仪(美国 ProteinSimple 公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

牛膝饮片购自安徽普仁中药饮片有限公司,经河南省中医药研究院王慧森副研究员鉴定,为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根;卡托普利片(批号 23080111, 规格 25 mg)购自常州制药厂有限公司;NO、内皮素 1(endothelin-1, ET-1)、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和 IL-6 的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为 ml093036、ml002890、ml107050、ml064292)均购自上海酶联生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号分别为 20240821、20240906、20240903、20240828)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;血管紧张素 II(angiotensin II, Ang- II)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的 ELISA 试剂盒(批号分别为 CSBE04494r、CSBE11987r、CSBE04576r)均购自武汉华美生物工程技术有限公司;20-HETE 的 ELISA 试剂盒(批号 20HG1)购自美国 Detroit R&D 公司;苏木精-伊红(HE)

染色试剂盒、二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)探针(批号分别为C0105S、Y257746)均购自上海碧云天生物技术有限公司;兔源CYP4A单克隆抗体、兔源内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)多克隆抗体、兔源p22<sup>phox</sup>多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab140635、ab317582、ab191512、ab6721)均购自英国Abcam公司;兔源GPR75、NF- $\kappa$ B p65、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)、NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为DF2761、AF5006、AF3387、DF6924、AF7021)均购自美国Affinity公司。

### 1.3 实验动物

40只雄性SPF级8周龄SHR及10只同背景、同周龄的雄性Wistar-Kyoto(WKY)大鼠(体重180~200 g)均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0006。动物购入后,饲养于河南省中医药研究院实验动物中心,饲养环境温度为22~25℃、相对湿度为50%~60%。本实验获得河南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(批准编号:HNTCMDW-20240301)。

## 2 方法

### 2.1 ABS提取物的制备

将牛膝饮片粉碎,过20目筛。称取200 g药材粉末,加入8倍量的95%乙醇加热回流提取3次,每次1 h;合并3次提取液,70℃水浴旋蒸浓缩至无醇味,用纯水将剩余提取液定容至2 L,超声10 min,抽滤;量取300 mL抽滤液,过D101型大孔吸附树脂柱,然后用1.2 L纯水洗脱其中的水溶性成分,再用70%乙醇1 L洗脱,收集乙醇洗脱液并干燥,得到ABS提取物。以齐墩果酸对照品为参照,采用紫外-可见分光光度法<sup>[7]</sup>进行分析,得到提取物中ABS的含量为54.76%。

### 2.2 动物分组与给药

所有大鼠适应性喂养1周后,将10只WKY大鼠设为正常对照组(CON组);40只SHR先根据收缩压进行分层,再采用随机数字表法分为模型组(MOD组)、卡托普利阳性对照组(CAP组,10 mg/kg,剂量参考文献[10]设置)和ABS提取物低、高剂量组(ABS-L、ABS-H组,60、120 mg/kg,剂量参考文献[7]设置),每组10只。CON组和MOD组大鼠灌胃纯水,其余各组大鼠灌胃相应药物,给药体积为10 mL/kg,每天1次,连续给药28 d。

### 2.3 收缩压测量

分别于给药前及给药后7、14、28 d,采用动物无创血压测试仪测量大鼠的尾动脉收缩压。测量前需确保环境安静、温暖。测量时,先打开加热垫对大鼠尾部加

热10 min,使尾动脉充盈;待大鼠安静稳定后,再开始测量。测量工作由专人在测量日的15:00—17:00进行。每只大鼠重复测量3次,取平均值作为当日收缩压。

### 2.4 血清中血管活性物质、炎症因子和氧化应激指标水平测定

末次给药后,各组大鼠禁食不禁水12 h,腹腔注射20%乌拉坦(5 mL/kg)麻醉,然后腹主动脉取血。血样于4℃下以1 000×g离心,分离血清,按照对应的试剂盒说明书操作,测定血清中血管活性物质(20-HETE、Ang-Ⅱ、NO、ET-1)、炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、ICAM-1)和氧化应激指标(SOD、MDA、GSH-Px、CAT)的水平。

### 2.5 胸主动脉病理形态学变化观察

采用HE染色法观察。取血后,小心分离大鼠胸主动脉,将部分胸主动脉放入-80℃冰箱中保存,用于后续检测。另取长度约0.5 cm的胸主动脉段,用4%多聚甲醛固定,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后制备石蜡切片(厚度为5  $\mu$ m),将切片脱蜡水化后进行HE染色,最后在光学显微镜下观察胸主动脉的病理形态学变化。

### 2.6 胸主动脉中活性氧水平测定

采用DHE探针法检测。将“2.5”项下分离的新鲜胸主动脉包埋于OCT中,制备厚度为5  $\mu$ m的切片。切片经磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2 min后,用5  $\mu$ mol/L的DHE在室温下避光孵育30 min;经PBS漂洗后封片,采用荧光显微镜观察并拍照,阳性表达呈红色荧光。采用Image J软件分析活性氧(reactive oxygen species, ROS)的荧光强度,荧光强度越强表示ROS水平越高。

### 2.7 胸主动脉中eNOS水平检测

采用免疫荧光法检测。将“2.5”项下胸主动脉切片脱蜡至水,用EDTA抗原修复液进行高温抗原修复,随后用PBS清洗3次,每次5 min;甩干切片后,以10%山羊血清在室温下封闭1 h;滴加eNOS一抗(稀释比例为1:200),于4℃下孵育过夜;PBS漂洗3次,滴加二抗(稀释比例为1:200),于37℃下避光孵育1 h;滴加DAPI复染细胞核,并用抗荧光淬灭封片剂封片。最后采用荧光显微镜观察并采集图像,阳性表达呈绿色荧光。用Image J软件计算eNOS荧光强度,荧光强度越强表明eNOS水平越高。

### 2.8 胸主动脉中CYP4A/20-HETE/GPR75轴相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。称取“2.5”项下冻存的胸主动脉(每只约100 mg),用RIPA裂解液提取组织中的总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度后将蛋白煮沸变性。取50  $\mu$ g蛋白上样进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压120 V,电泳时间90 min),电泳结束后电转(电流200 mA,转膜时间60 min)至PVDF膜,在室

温下用5%脱脂奶粉封闭2 h;TBST洗膜后,分别加入一抗(CYP4A、GPR75、p-NF-κB p65、NF-κB p65、p22<sup>phox</sup>、NOX4、GAPDH)的稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:500、1:800、1:600、1:800、1:7 000,4 °C孵育过夜;TBST洗膜后加入二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育1 h;滴加ECL发光液曝光并拍照。采用Image J软件进行定量分析,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,以p-NF-κB p65与NF-κB p65蛋白条带的灰度值比值表示NF-κB p65蛋白的磷酸化水平。

## 2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 ABS提取物对SHR收缩压的影响

给药前,各组大鼠的收缩压均显著高于CON组( $P<0.01$ )。给药后,与CON组比较,MOD组大鼠各对应时间点的收缩压均显著升高( $P<0.01$ );与MOD组比较,CAP组大鼠的收缩压从给药后7 d开始显著降低( $P<0.01$ ),ABS-H组大鼠的收缩压从给药后14 d开始显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),ABS-L组大鼠的收缩压从给药后28 d开始显著降低( $P<0.05$ )。结果见表1。

表1 各组大鼠的收缩压比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	给药前	给药后		
		7 d	14 d	28 d
CON组	135.75±12.24	138.73±13.12	138.46±12.86	137.62±12.75
MOD组	184.28±17.35 <sup>a</sup>	186.18±17.46 <sup>a</sup>	188.20±18.32 <sup>a</sup>	189.35±18.66 <sup>a</sup>
CAP组	185.34±16.66 <sup>a</sup>	153.46±15.80 <sup>b</sup>	148.46±14.65 <sup>b</sup>	145.71±13.82 <sup>b</sup>
ABS-L组	183.90±17.08 <sup>a</sup>	179.22±16.69	173.23±16.83	167.16±16.75 <sup>c</sup>
ABS-H组	184.66±16.75 <sup>a</sup>	171.65±16.14	166.72±15.78 <sup>c</sup>	161.34±15.09 <sup>c</sup>

a:与CON组比较, $P<0.01$ ;b:与MOD组比较, $P<0.01$ ;c:与MOD组比较, $P<0.05$ 。

### 3.2 ABS提取物对SHR血清中血管活性物质水平的影响

与CON组比较,MOD组大鼠血清中20-HETE、Ang-Ⅱ和ET-1水平均显著升高( $P<0.01$ ),NO水平显著降低( $P<0.01$ );与MOD组比较,各给药组大鼠血清中20-HETE(除CAP组外)、Ang-Ⅱ和ET-1水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),NO水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表2。

### 3.3 ABS提取物对SHR血清中炎症因子水平的影响

与CON组比较,MOD组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α和ICAM-1水平均显著升高( $P<0.01$ );与MOD组比较,各给药组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α和ICAM-1水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表3。

表2 各组大鼠血清中血管活性物质水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	20-HETE/(ng/L)	Ang-Ⅱ/(ng/L)	NO/(μmol/L)	ET-1/(ng/L)
CON组	416.83±44.28	67.92±12.85	33.11±3.77	103.87±17.68
MOD组	627.57±71.44 <sup>a</sup>	122.40±17.37 <sup>a</sup>	20.57±2.95 <sup>a</sup>	165.39±24.72 <sup>a</sup>
CAP组	598.35±63.96	75.67±13.49 <sup>b</sup>	29.79±3.56 <sup>b</sup>	121.76±20.25 <sup>b</sup>
ABS-L组	553.06±56.82 <sup>a</sup>	101.35±15.92 <sup>b</sup>	25.36±3.04 <sup>b</sup>	138.15±21.48 <sup>b</sup>
ABS-H组	492.62±51.40 <sup>b</sup>	88.73±14.68 <sup>b</sup>	28.41±3.41 <sup>b</sup>	126.63±19.46 <sup>b</sup>

a:与CON组比较, $P<0.01$ ;b:与MOD组比较, $P<0.01$ ;c:与MOD组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠血清中炎症因子水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/L}$ )

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α	ICAM-1
CON组	75.03±11.64	47.14±5.97	12.87±1.69	253.75±21.06
MOD组	118.41±20.82 <sup>a</sup>	71.36±9.76 <sup>a</sup>	24.85±3.53 <sup>a</sup>	327.80±26.38 <sup>a</sup>
CAP组	89.28±16.19 <sup>b</sup>	55.19±7.04 <sup>b</sup>	17.46±2.59 <sup>b</sup>	269.07±22.29 <sup>b</sup>
ABS-L组	96.62±17.56 <sup>a</sup>	60.50±8.12 <sup>c</sup>	20.81±2.97 <sup>b</sup>	293.41±25.16 <sup>c</sup>
ABS-H组	86.85±14.90 <sup>b</sup>	52.87±6.73 <sup>b</sup>	16.69±2.31 <sup>b</sup>	278.25±23.43 <sup>b</sup>

a:与CON组比较, $P<0.01$ ;b:与MOD组比较, $P<0.01$ ;c:与MOD组比较, $P<0.05$ 。

### 3.4 ABS提取物对SHR血清中氧化应激指标水平的影响

与CON组比较,MOD组大鼠血清中SOD、GSH-Px和CAT水平均显著降低( $P<0.01$ ),MDA水平显著升高( $P<0.01$ );与MOD组比较,各给药组大鼠血清中SOD、GSH-Px和CAT水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),MDA水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表4。

表4 各组大鼠血清中氧化应激指标水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	SOD/(kU/L)	MDA/(μmol/L)	GSH-Px/(kU/L)	CAT/(kU/L)
CON组	82.18±10.26	3.83±0.47	97.95±13.53	12.67±1.72
MOD组	45.65±5.77 <sup>a</sup>	9.64±1.29 <sup>a</sup>	49.36±7.84 <sup>a</sup>	7.16±0.86 <sup>a</sup>
CAP组	67.86±7.13 <sup>b</sup>	4.96±0.51 <sup>b</sup>	81.83±9.35 <sup>b</sup>	10.55±1.47 <sup>b</sup>
ABS-L组	58.32±6.74 <sup>a</sup>	7.32±1.06 <sup>c</sup>	65.90±10.04 <sup>c</sup>	9.22±1.53 <sup>c</sup>
ABS-H组	71.75±8.65 <sup>b</sup>	5.49±0.72 <sup>b</sup>	85.64±12.18 <sup>b</sup>	11.02±1.64 <sup>b</sup>

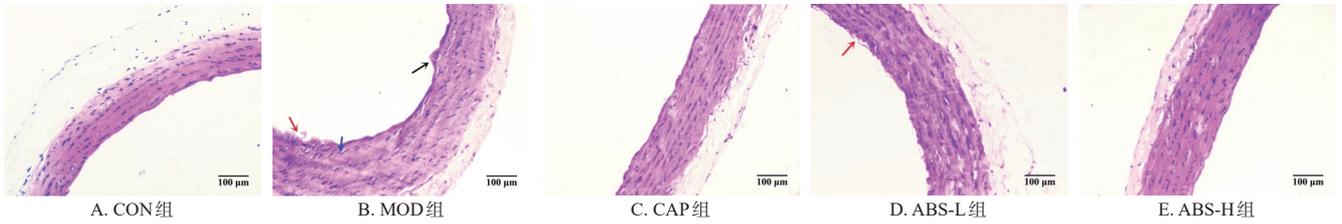
a:与CON组比较, $P<0.01$ ;b:与MOD组比较, $P<0.01$ ;c:与MOD组比较, $P<0.05$ 。

### 3.5 ABS提取物对SHR胸主动脉病理形态学的影响

CON组大鼠胸主动脉结构正常,内膜完整光滑,无异常隆起,中膜平滑肌细胞排列整齐,外膜结构较清晰;与CON组比较,MOD组大鼠胸主动脉内膜损伤显著,可见明显隆起,内膜结构不完整、断裂,内皮细胞形态异常且排序紊乱,中膜明显增厚,平滑肌细胞层数增多且排列紊乱;与MOD组比较,各给药组大鼠胸主动脉内膜损伤均有不同程度减轻,内膜结构及内皮细胞形态等均得到不同程度改善,中膜厚度变薄。结果见图1。

### 3.6 ABS提取物对SHR胸主动脉中ROS水平的影响

与CON组[荧光强度为 $94.29 \pm 11.61$ ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ,下同)]比较,MOD组大鼠胸主动脉中ROS的荧光强度( $158.67 \pm 20.34$ )显著增强( $P<0.01$ );与MOD组比较,



注:黑色箭头所指为内膜隆起;红色箭头所指为内膜断裂;蓝色箭头所指为中膜增厚。

图1 各组大鼠胸主动脉病理形态学观察的显微图(HE染色)

CAP组、ABS-L组和ABS-H组大鼠胸主动脉中ROS的荧光强度(分别为 $121.22 \pm 15.06$ 、 $134.31 \pm 17.37$ 、 $118.76 \pm 15.59$ )均显著减弱( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见图2。

### 3.7 ABS提取物对SHR胸主动脉中eNOS水平的影响

与CON组[荧光强度为 $81.55 \pm 11.87$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,下同)]比较,MOD组大鼠胸主动脉中eNOS的荧光强度( $39.46 \pm 7.18$ )显著减弱( $P < 0.01$ );与MOD组比较,CAP组、ABS-L组和ABS-H组大鼠胸主动脉中eNOS的荧光强度(分别为 $73.73 \pm 9.95$ 、 $55.65 \pm 7.67$ 、 $71.46 \pm 10.34$ )均显著增强( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见图3。

### 3.8 ABS提取物对SHR胸主动脉中CYP4A/20-HETE/GPR75轴相关蛋白表达的影响

与CON组比较,MOD组大鼠胸主动脉中CYP4A、GPR75、p22<sup>phox</sup>、NOX4蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白

的磷酸化水平均显著升高( $P < 0.01$ );与MOD组比较,各给药组大鼠胸主动脉中CYP4A(除CAP组外)、GPR75(除CAP组外)、p22<sup>phox</sup>、NOX4蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见图4、表5。

## 4 讨论

血管内皮功能损伤既是高血压的重要病理特征,也是高血压靶器官损害的共同病理基础,因此保护血管内皮功能是防治高血压及其相关靶器官损害的关键策略<sup>[11]</sup>。血管内皮不仅是机体血液循环与组织间的物理屏障,而且能分泌多种血管活性物质来调节血管收缩与舒张,在维持血管稳态、控制血压、保护心脏等方面发挥重要作用<sup>[12]</sup>。NO是血管内皮细胞在eNOS催化下生成的舒张因子,其水平降低是内皮功能损伤的标志特征<sup>[13]</sup>。ET-1则是强效缩血管因子,通过与ET-A受体耦

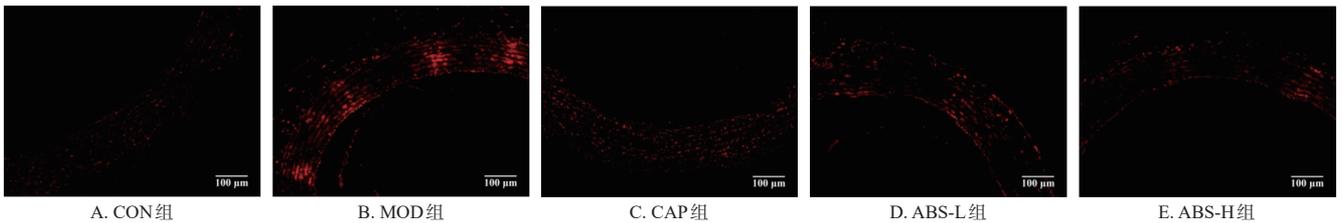


图2 各组大鼠胸主动脉中ROS水平检测的荧光显微图(DHE探针法)

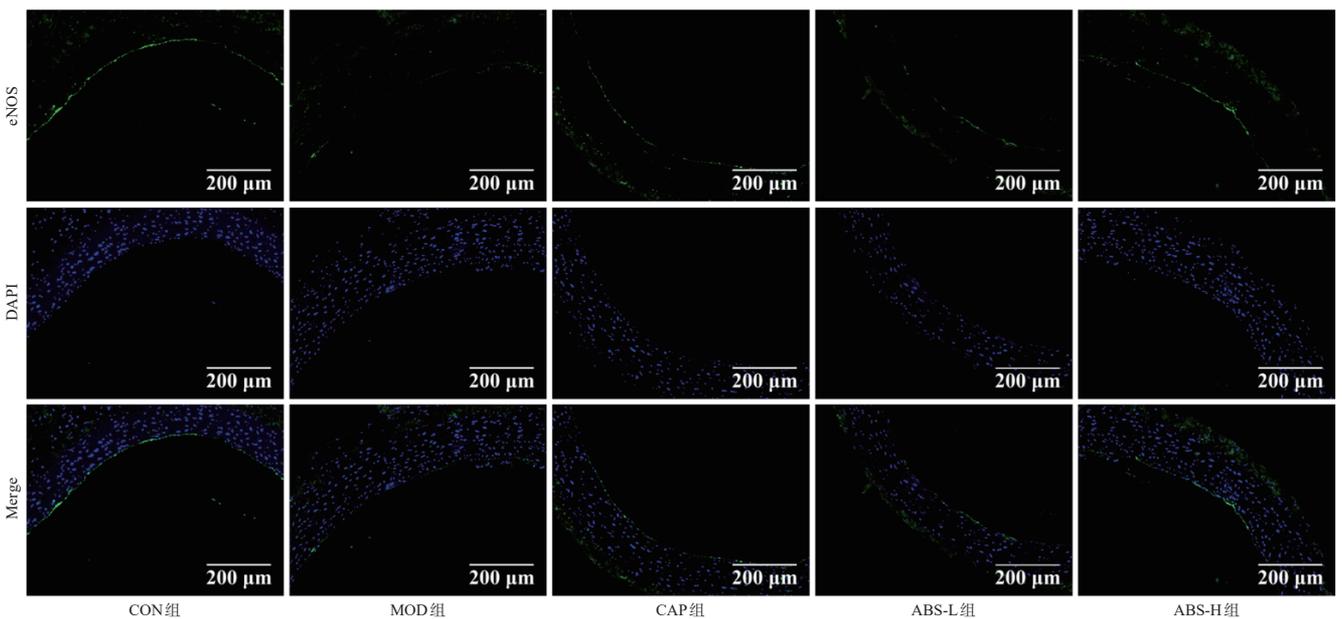
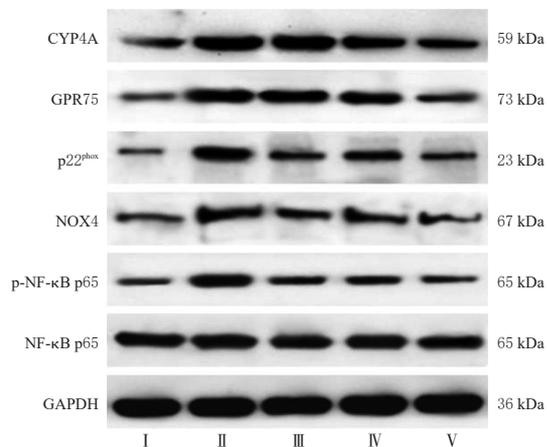


图3 各组大鼠胸主动脉中eNOS水平检测的荧光显微图(免疫荧光染色)



I: CON组; II: MOD组; III: CAP组; IV: ABS-L组; V: ABS-H组。

图4 各组大鼠胸主动脉中 CYP4A/20-HETE/GPR75 轴相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠胸主动脉中 CYP4A/20-HETE/GPR75 轴相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	CYP4A/ GAPDH	GPR75/ GAPDH	p22 <sup>phox</sup> / GAPDH	NOX4/ GAPDH	p-NF-κB p65/ NF-κB p65
CON组	0.37 ± 0.08	0.26 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.06
MOD组	0.76 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.14 <sup>a</sup>
CAP组	0.70 ± 0.12	0.66 ± 0.12	0.49 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.10 <sup>b</sup>
ABS-L组	0.59 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.54 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.54 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.66 ± 0.12 <sup>c</sup>
ABS-H组	0.45 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>b</sup>

a: 与CON组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与MOD组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与MOD组比较,  $P < 0.05$ 。

合升高游离钙浓度,促使血管平滑肌收缩、血压升高;同时激活磷脂酶C,促进平滑肌细胞增殖,导致血管中膜增厚,最终引发血管重构<sup>[14]</sup>。Ang- II 可通过诱导炎症反应、增加内皮细胞通透性、参与血管重塑等机制引起内皮功能障碍<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与正常对照大鼠相比,SHR收缩压显著升高,血清中NO水平显著降低,ET-1、Ang- II 水平显著升高,胸主动脉中eNOS表达下调,且血管内皮损伤明显、中膜增厚;而ABS提取物可降低SHR收缩压,升高血清中NO水平,降低ET-1、Ang- II 水平,上调胸主动脉中eNOS表达,逆转血管内皮损伤和中膜增厚。这表明ABS提取物能够改善SHR血管内皮功能损伤。

炎症反应不仅是血管内皮功能损伤发生的始动因素,而且是加剧血管内皮功能损伤的关键机制<sup>[16]</sup>。IL-6可诱导内皮细胞产生大量ROS,进而破坏线粒体结构、降低线粒体膜电位,引发线粒体功能障碍,最终导致内皮细胞损伤<sup>[17]</sup>。TNF-α通过与细胞表面的TNF受体结合,进而激活下游的胱天蛋白酶家族,引发内皮细胞凋亡,导致血管内皮屏障功能受损<sup>[18]</sup>。此外,IL-1β可诱导黏附分子(如ICAM-1)的表达,促进免疫细胞与内皮细胞的黏附和迁移,黏附的白细胞会释放更多的炎症因子和蛋白酶,加剧内皮细胞损伤<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,与

正常对照大鼠比较,SHR血清中IL-1β、IL-6、TNF-α和ICAM-1水平显著升高,而ABS提取物可显著降低SHR血清中IL-1β、IL-6、TNF-α和ICAM-1水平。这表明ABS提取物对SHR血管炎症具有抑制作用。

氧化应激发生时,ROS的生成速率超过机体的清除能力,过量的ROS通过降低NO生物利用度、氧化线粒体心磷脂及损伤DNA等途径,抑制内皮依赖性血管舒张功能,减少内皮细胞间的连接,进而造成内皮功能损伤<sup>[20]</sup>。在多种产生ROS的酶中,NOX是ROS的重要来源之一,其中NOX4是NOX在血管组织中的主要表达亚型,而p22<sup>phox</sup>是NOX4的关键催化亚基<sup>[21]</sup>。机体内存在SOD、CAT、GSH-Px等抗氧化酶系统,其中SOD的作用主要是清除超氧阴离子,CAT的作用主要是分解过氧化氢,GSH-Px的作用主要是清除脂质过氧化物。当体内抗氧化系统功能减退时,ROS会不断积累,导致脂质过氧化产物MDA含量升高,加剧氧化损伤<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,SHR血清中SOD、CAT和GSH-Px水平显著降低,MDA水平显著升高,胸主动脉中ROS水平显著升高;而ABS提取物可显著升高SHR血清中SOD、CAT和GSH-Px水平,显著降低血清中MDA及胸主动脉中ROS水平。这表明ABS提取物能够降低SHR的氧化应激水平。

病理状态下,AA可被CYP4A催化生成20-HETE。作为GPR75受体的天然配体,20-HETE激活GPR75后,会促进与其结合的蛋白偶联受体激酶2相互作用蛋白1激活细胞型Src(cellular Src, cSrc),cSrc与表皮生长因子受体结合并使之磷酸化,磷酸化的表皮生长因子受体通过激活NF-κB通路,引发血管炎症和eNOS解聚<sup>[23]</sup>。20-HETE还可通过激活NADPH的重要催化亚基p22<sup>phox</sup>,激活NOX系统并产生大量ROS,导致氧化应激反应的发生<sup>[24]</sup>,最终导致血管内皮功能损伤。本研究结果显示,SHR血清中20-HETE水平以及胸主动脉中CYP4A、GPR75、p22<sup>phox</sup>、NOX4蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高;ABS提取物干预后,SHR血清中20-HETE水平以及胸主动脉中CYP4A、GPR75、p22<sup>phox</sup>、NOX4蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均有不同程度降低。这表明ABS提取物可能通过减少AA经CYP4A代谢生成20-HETE,进而抑制NF-κB信号通路和NOX系统,从而改善SHR血管内皮功能。

综上所述,ABS提取物可能通过下调CYP4A表达,减少20-HETE生成,抑制GPR75激活,进而抑制下游NF-κB和NOX4的活化,有效减轻SHR的炎症反应和氧化应激,从而改善其高血压相关血管内皮功能损伤。但ABS提取物对血管内皮功能损伤的改善作用涉及的其他机制,尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王馨,周好奇,陈祚,等.我国中青年人群高血压流行和治疗控制现状[J].中华心血管病杂志,2022,50(12):1169-1176.
- [2] HUANG X D, HUANG X W, PAN M D, et al. Effect of early endothelial function improvement on subclinical target organ damage in hypertensives[J]. Sci Rep, 2024, 14(1):16078.
- [3] FEUGRAY G, PEREIRA T, IACOB M, et al. Determination of lipoxygenase, CYP450, and non-enzymatic metabolites of arachidonic acid in essential hypertension and type 2 diabetes[J]. Metabolites, 2022, 12(9):859.
- [4] FROOGH G, GARCIA V, LANIADO SCHWARTZMAN M. The CYP/20-HETE/GPR75 axis in hypertension[J]. Adv Pharmacol, 2022, 94:1-25.
- [5] 王梦艳,刘杰,黄聿,等.非血管性疾病与动脉粥样硬化:内皮炎症和氧化应激的关键作用[J].中国动脉硬化杂志,2023,31(4):287-296.
- [6] 周凌,张湘苑,金籽杉,等.重构本草:牛膝[J].吉林中医药,2023,43(2):218-221.
- [7] 宋献美,许波,张欢欢,等.牛膝总皂苷对类风湿关节炎大鼠 Th17/Treg 平衡和滑膜组织中 IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$  的影响[J].中医研究,2020,33(3):70-73.
- [8] 周燕,余佳文,黄晓明,等.怀牛膝总皂苷对大鼠急性心肌缺血心肌钙蛋白 T 与血管内皮功能的影响[J].江西中医学院学报,2010,22(5):67-69.
- [9] LI Z Z, MA D J, PENG L P, et al. Compatibility of *Achyranthes bidentata* components in reducing inflammatory response through arachidonic acid pathway for treatment of osteoarthritis[J]. Bioengineered, 2022, 13(1):1746-1757.
- [10] LUO X S, HAN Z Y, KONG Q, et al. *Clostridium butyricum* prevents dysbiosis and the rise in blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5):4955.
- [11] TOMIYAMA H. Vascular function: a key player in hypertension[J]. Hypertens Res, 2023, 46(9):2145-2158.
- [12] 田静,马英杰,王鹏,等.血管内皮功能障碍及其评估技术[J].中国比较医学杂志,2023,33(7):130-140.
- [13] BRYAN N S. Nitric oxide deficiency is a primary driver of hypertension[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 206:115325.
- [14] GUTIÉRREZ A, GÓMEZ DEL VAL A, CONTRERAS C, et al. Calcium handling coupled to the endothelin ET $_A$  and ET $_B$  receptor-mediated vasoconstriction in resistance arteries: differential regulation by PI3K, PKC and RhoK[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 956:175948.
- [15] PANG Z D, SUN X, BAI R Y, et al. YAP-galectin-3 signaling mediates endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension in mice[J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(2):38.
- [16] LI B W, ZHANG Q J, YANG R, et al. Characteristics of inflammatory and normal endothelial exosomes on endothelial function and the development of hypertension[J]. Inflammation, 2024, 47(4):1156-1169.
- [17] CHELOMBITKO M A, GALKIN I I, PLETJUSHKINA O Y, et al. Effect of antioxidants on the production of MCP-1 chemokine by EA.hy926 cells in response to IL-6[J]. Moscow Univ Biol Sci Bull, 2022, 77(3):184-191.
- [18] LEI L J, CHEN M H, WANG C Y, et al. Trichostatin D as a novel KLF2 activator attenuates TNF $\alpha$ -induced endothelial inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21):13477.
- [19] LIN S G, ZHU P W, JIANG L J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-1 $\beta$  promote endothelial dysfunction and aggravate limb ischemia[J]. Hypertens Res, 2024, 47(6):1654-1667.
- [20] SHARMA A, PATIL S M, DASGUPTA A, et al. Unraveling the intricate relationship between oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension[J]. Cureus, 2024, 16(5):e61245.
- [21] OLIVEIRA T S, CAMPOS H M, COSTA R M, et al. Estrone-mediated lowering of ROS and NOX4 improves endothelial function in ovariectomized wistar rats[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2024, 397(9):7103-7115.
- [22] 刘桂英,牛丽,常雪允,等.芍药苷对妊娠期糖尿病大鼠糖代谢、炎症、氧化应激的改善作用及机制[J].中国药房,2024,35(12):1476-1481.
- [23] TUNCTAN B, SENOL S P, TEMIZ-RESITOGU M, et al. Activation of GPR75 signaling pathway contributes to the effect of a 20-HETE mimetic, 5, 14-HEDGE, to prevent hypotensive and tachycardic responses to lipopolysaccharide in a rat model of septic shock[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(2):276-293.
- [24] HAN Y, ZHAO H Y, TANG H, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates isolated heart ischemia/reperfusion injury by increasing NADPH oxidase-derived reactive oxygen species production[J]. Circ J, 2013, 77(7):1807-1816.

(收稿日期:2025-09-10 修回日期:2026-01-03)

(编辑:林静)